

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :
(A n'utiliser que pour les
commandes de reproduction).

2 519 020

A1

**DEMANDE
DE BREVET D'INVENTION**

(21)

N° 82 20003

(54) Procédé pour la culture de cellules d'organismes supérieurs et dispositif pour réaliser ce procédé.

(51) Classification internationale (Int. Cl.³). C 12 M 3/00.

(22) Date de dépôt 29 novembre 1982.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : CS, 29 décembre 1981, n° PV 9955-81.

(41) Date de la mise à la disposition du
public de la demande B.O.P.I. — « Listes » n° 26 du 1-7-1983.

(71) Déposant : SPOFA, SPOJENE PODNIKY PRO ZDRAVOTNICKOU VYROBU. — CS.

(72) Invention de : Vladislav Vicek, Jan Kybal et Jindrich Chromik.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Cabinet Bert, de Keravenant et Herrburger,
115, bd Haussmann, 75008.

tifs courants de fermentation ne peuvent être utilisés pour leur culture.

Jusqu'à présent, il n'a été possible de cultiver avec succès des cellules d'organismes supérieurs qu'à l'échelle de laboratoire, dans de faibles volumes de liquide, dans des flacons ou boîtes de Petri ou dans des flacons en rotation continue sur un axe horizontal, dans des dispositifs dits à roulement.

On connaît un dispositif simple et utilisable à l'échelle industrielle, pour la culture immobile de microorganismes aérobies sur la surface d'un milieu de culture liquide, dont on remplit, après inoculation, des sacs de plastique élastiques et flexibles par exemple des sacs de polyéthylène gonflés avec de l'air stérile, et que l'on aère au cours de la culture avec de l'air que l'on envoie sur la surface de la culture en cours de croissance. (Certificat de l'auteur n° 172 552).

La poursuite des recherches a prouvé que ce dispositif peut être utilisé, avec de petites modifications, pour la culture de cellules en suspension d'organismes supérieurs, à l'échelle industrielle.

En conséquence, l'invention a pour objet un procédé de culture de cellules d'organismes supérieurs, la culture ayant lieu par exemple en suspension dans un milieu de culture fluide, dans des récipients à parois souples et/ou élastiques, de préférence sous forme de sac, ces récipients étant pourvus d'une entrée pour le gaz d'aération et les éléments nutritifs. Le principe du procédé consiste en ce que la culture est effectuée sous mélange continu ou périodique du milieu de culture assuré par un mouvement ondulatoire provoqué par des variations continues ou périodiques de la position d'au moins un côté du récipient de culture.

L'invention a également pour objet un

appropriée est disposé sur la structure plane.

La structure plane 1 de dimensions superficielles limitées constituant la partie essentielle du dispositif selon l'invention et désignée dans la suite, pour simplifier, par le terme "support", peut avoir une surface entièrement unie et lisse (voir figures 1 et 2), ou inégale 5, de formes variées, régulières ou irrégulières, pourvue d'ouvertures 6 de forme avantageuse (figures 3 et 4), si nécessaire, qui peuvent constituer une grille ou un réseau dans le cas limite (non illustré). Par cette modification de la surface du support 1, on peut conférer la forme souhaitée au fond du sac 7 de culture. Un ou plusieurs corps de forme appropriée (non représentés en particulier) peuvent servir au même objet, ces corps étant simplement posés sur la surface unie du support 1 en cas de besoin. Il apparaît également possible de combiner les ouvertures 6 du support 1 avec une forme appropriée de la surface 5 ou avec des corps façonnés mobiles.

Le support 1 peut être muni en outre de moyens fixes ou amovibles 2 pour fixer le sac de culture 7, par exemple des plaques latérales fixes ou à bascule et/ou ajustables, d'une réalisation arbitraire appropriée (il peut s'agir par exemple simplement d'un repli des bords du support 1), ce qui permet l'utilisation du support 1 d'une certaine dimension de base pour des sacs de culture 7 de dimensions et de formes variées.

Lorsque c'est nécessaire, le support 1 peut être muni d'un dispositif ajustant la température qui peut constituer seul tout le support 1, y compris les moyens 2 pour fixer le sac de culture 7 dans la case qui le limite.

La variation continue ou périodique de la position du support 1 avec le sac de culture 7, assurant le mélange du milieu de culture par un mouvement

de culture, soit en contact avec un coussin d'air continuellement renouvelé, ce qui assure en même temps un transfert suffisant de l'oxygène dans les cellules de développement. L'efficacité du mélange par mouvement
5 ondulatoire peut être encore augmentée en conférant au support 1 la forme d'une grille, le fond du sac de culture 7 souple rempli de milieu de culture prenant, sous l'effet de son poids, la forme de plusieurs rainures perpendiculaires à la direction du mouvement ondulatoire.
10 re. Ceci permet d'activer non seulement le mélange de la suspension cellulaire, mais aussi l'oxydation du milieu de culture, comme le ferait un barrage.

Le dispositif de l'invention sert avant tout à la culture de cellules en suspension libre,
15 dont la reproduction et le développement sont conditionnés par l'accrochage sur la surface de substrat solide (par exemple de fibroblastes). Ces cellules se développent alors sur la paroi intérieure du sac de culture 7, la surface effective d'accrochage et de développement
20 des cellules pouvant être augmentée en plus sensiblement par addition de micro-vecteurs suspendus dans le milieu de culture.

Dans le dispositif selon l'invention, l'amplitude et la fréquence du mouvement, l'étendue de
25 la surface du milieu de culture, l'écoulement de l'air, la température et la durée de la culture peuvent être optimisés de façon empirique pour un type de cellules donné et une composition déterminée du milieu de culture.

30 Le procédé et le dispositif suivant l'invention s'appliquent aussi de préférence à la culture de microorganismes fibrillés, à la surface de milieu de culture liquide. Si la culture est maintenue immobile, la lenteur de la diffusion des produits nutritifs de la solution vers le haut, c'est-à-dire vers les
35

fin de l'incubation, le mycélium développé a été recueilli, rincé à l'eau, séché, pesé, et la teneur en alcaloïdes a été déterminé. Avec l'incubation soumise à un mouvement ondulatoire périodique du milieu de culture, il a été obtenu en moyenne 14 % de plus de mycélium en poids sec, avec une teneur en alcaloïdes de 35 % plus élevée que dans le cas où l'incubation s'est effectuée tout le temps au repos.

Exemple 2 :

10 La culture a été effectuée dans le même dispositif que dans l'exemple 1. Une culture de cellules en suspension de l'espèce *Vincea rosea*, dérivé de callus de tige, a été utilisée. Le remplissage s'est effectuée comme dans l'exemple 1, la durée de culture
15 a été de 14 jours à la température de 24°C, dans un milieu contenant 3 % en poids de saccharose et 2×10^{-6} moles d'acide 2,4-dichloro-phénoxy-acétique (T. Murashige, F. Shoog, *Physiol. Plant.* 15, 473, 1962). La culture s'est déroulée sous oscillations continues,
20 avec des hauteurs d'oscillation de 4 mm et une fréquence d'oscillations de 10 secondes. Pendant toute la durée de la culture, il a été effectué une aération à raison de 30 ml d'air/minute/1000 cm². Il a été inséré avec l'inoculum 3×10^5 cellules par ml dans le sac 7 de cul-
25 ture, rempli de 2500 ml du milieu de culture. Après la fin de la culture, on a trouvé 35×10^5 cellules/ml.

